ADANSONIA, sér. 2, **12** (3) : 389-402. 1972.

ÉTUDES EMBRYOLOGIQUES DANS LE GENRE *CYNORKIS (ORCHIDACEAE)*

par Yvonne VEYRET

RÉSUMÉ : Les *C. ridleyi* Dur. et Schinz., *C. ampullacea* H. Perr. et l'hybride présumé *C. lilacina* × *C. ridleyi* H. Perr. sont apomictiques autonomes absolus. L'archéspore est la CMM; elle avorte ou dépasse rarement le stade dyade suivant les espèces. Ses produits ne sont pas fonctionnels. L'embryonie est soit nucellaire, soit omnisaccale diploïde; ce dernier mode est nouveau.

SUMMARY : *C. ridleyi* Dur. et Schinz., *C. ampullacea* H. Perr. and the presumed hybrid *C. lilacina* × *C. ridleyi* H. Perr. are obligate autonomous apomicts. Archespore is the MMC; generaly is aborts or give rise to dyad cells according to the species. Its products are not functionnal. Embryony is nucellar or omnisaccal diploid; this last modality is new.

Le genre *Cynorkis* groupe actuellement environ 140 espèces; l'une d'elles est asiatique, un petit nombre se rencontrent en Afrique tropicale et australe, les autres sont spéciales à la région malgache : Madagascar, Comores, Mascareignes, Seychelles; mais la majorité sont endémiques de la Grande Ile.

Ces espèces sont réparties dans 6 sections suivant le nombre de viscidies et diverses caractéristiques du rostellum. Les espèces présentement étudiées appartiennent toutes à la première section du genre, qui rassemble plus de la moitié des *Cynorkis*, mais elles y sont classées dans des groupes différents : le *C. ridleyi* Dur. et Schinz. dans le premier, le *C. ampullacea* H. Perr. dans le troisième, l'hybride présumé *C. lilacina* × *C. ridleyi* a le premier de ses parents dans le deuxième groupe.

Chez toutes ces espèces le mode de reproduction asexué était évident avant d'en avoir la preuve microscopique; en effet le pollen peut être avorté ou les pollinies rester en place et le stigmate ne porter aucune trace de pollen; malgré cela elles développent des ovules pourvus d'embryons. Dans tous les cas l'apomixie est autonome et absolue mais les modalités de la reproduction apomictique présentent des différences suivant ces espèces et en conséquence nous examinerons celles-ci successivement.

ance is quite distinct from that of collagenous fibers. In their staining properties under the light microscope and in their electron microscopical appearance these fibers resemble those described by Bouillon and Vandermeerssche (1956), though only low power micrographs were presented by these authors. The ultrastructure of the medusan fibers differs from that of the spirit blue fibers described from *Polyphysia*, *Peripatus* and molluscan tissues (Elder and Owen, 1967) in being composed of aggregates of filaments associated together apparently by cross bridges (Elder, 1966b).

A loose network of fine fibers, some 10 nm in diameter, is also present throughout the mesoglea (Fig. 2b). The filaments resemble those found in the mesoglea of *Corymorpha* above. Though not so dense as in the latter species, these filaments are probably responsible for the diffuse collagen-like staining reactions of the medusan mesogleal matrix. In the stauromedusan *Craterolophus convolutus* they form a coarse network visible with the light microscope (Smith and Elder, 1967).

In the Phylum Ctenophora the collenchyme was found to contain a network of spirit blue staining fibers (Fig. 1c) in *Mnemiopsis leidyi*, the only species examined.

Dermal connective tissues

In view of the important role which the elastic fibers of the body wall have in the locomotion of the polychaete *Polyphysia* (Elder, 1972; and 1973), it was considered worthwhile investigating the dermal connective tissue organization and composition in a variety of burrowing invertebrates. Radially oriented spirit blue positive fibers were encountered in the body wall connective tissues of at least some members of the Nemertea, Annelida, Sipunculida, Aschelminthes (Priapulida), Onycophora, Echinodermata (Holothuria) and Hemichordata.

(*a*). *Apodous holothurian body wall.* It was of great interest to find a thick dermal connective tissue layer comprising both collagenous and spirit blue positive fibers in the burrowing apodous holothurian *Leptosynapta tenuis*. The collagen fibers are organized in a three dimensional lattice which would allow radial, circumferential or longitudinal extension. Tangential sections (Fig. 1d) show that the fibers are organized in right and left handed helices around the long axis of the body while transverse (Fig. 1e) or longitudinal sections reveal that the fibers pass from one level to another, integrating the system radially. In the superficial levels of the dermis the collagen fibers are sparse but stout bundles are always found traversing the connective tissue to attach to the epidermal basement membrane (Fig. 1f). Most of the volume of the superficial dermal layer is occupied by a "felt-like" network of fine fibers which stain with the spirit blue and aldehyde fuchsin techniques (Fig. 1f). Radially oriented spirit blue positive fibers are also readily demonstrated traversing this layer (Fig. 1f). It is not clear whether the latter are discrete fibers or simply condensations of the felt-like network. While the spirit blue positive "felt" and the radial fibers are most easily seen in the superficial dermal layer, the radial fibers can be traced inwards through the collagen lattice to the muscle layer and the fine fiber network forms an envelope investing the collagen bundles. Under the electron microscope the fine "felt" and the collagen fibers have been found (Fig. 2d) but the radially oriented fibers have not yet been located.

Staining with alcian blue 8GX and Hale's dialyzed iron methods revealed a distribution of acid mucopolysaccharides similar to that of the fine fibrous network. While the radially oriented fibers are stained they do not appear to take these dyes more strongly than the surrounding felt-work, as they might be expected to do if they are simply condensations of that network. Fullmer (1960) has shown that aldehyde fuchsin stains some acid mucopolysaccharides after peracetic oxidation and it may be that the affinity of the fine network fibers for spirit blue or aldehyde fuchsin after permanganate oxidation is also due to the presence of acid mucopolysaccharides.

The bases of the epithelial cells are separated from each other by spaces, apparently fluid filled, which frequently extend through most of the height of the epithelium. Tangential sections through the epithelium, stained as above for glycosaminoglycans, show each cell outlined by this space, strongly stained for acid mucopolysaccharides. Electron micrographs reveal that the fine felt-work fibers penetrate radially through the space to attach apically by hemi-desmosomes.

(*b*). *Burrowing mechanism in* Leptosynapta. In an attempt to determine the significance of the complex dermal connective tissue construction, observations were made on the burrowing mechanism of *Leptosynapta*. Electronic flash photographs were taken of specimens moving over the substratum and burrowing into it and of animals burrowing in sand sandwiched between glass plates. Coelomic pressure recordings using a Statham pressure transducer and pen recorder have also been made (Hunter and Elder, 1967). These studies will be reported fully elsewhere. For present purposes it is sufficient to note that, with reference to *Leptosynapta*, previous accounts of the burrowing mechanism in holothurians (Gerould, 1897; Clark, 1901; Yamanouchi, 1926, 1929) summarized in Trueman and Ansell (1969) are inadequate or erroneous. Burrow excavation is performed by the lateral scraping of the ring of circum oral tentacles, and body progression is achieved by means of direct peristaltic waves involving simultaneous longitudinal and circular muscle contraction. At no phase of the burrowing activity is a "terminal anchor" formed and the periodic contractions of the longitudinal musculature are associated with burrow consolidation (Hunter and Elder, 1967), not with pulling the body up to a terminal anchor (Trueman and Ansell, 1969). Figure 2e shows a peristaltic constriction travelling anteriorily along the body of *Leptosynapta* during forward locomotion. This type of locomotory and burrowing mechanism has been described before only for the polychaete *Polyphysia crassa* (Elder, 1973).

During the passage of the peristaltic constriction the radial dimension of the body wall probably increases signifiacntly. The construction of the three dimensional collagen lattice allows radial increase when circular and longitudinal muscle are contracted simultaneously and, as in *Polyphysia*, the radially oriented spirit blue fibers are probably extended in this configuration of the body wall.

(*c*). *Pedate holothurian body wall.* Sections of the pedate holothurian *Thyone briareus* revealed a thick dermal layer, the staining reactions of which suggest that it is composed principally of dense collagenous layers. A suggestion of spirit blue staining material was present but no discrete fibers were distinguishable.

(*d*). *Sipunculid burrowing and body wall structure. Golfingia gouldi* may be taken as representative of burrowers of the terminal anchorage type. Regions of the trunk form a penetration anchor during forceful protrusion of the proboscis

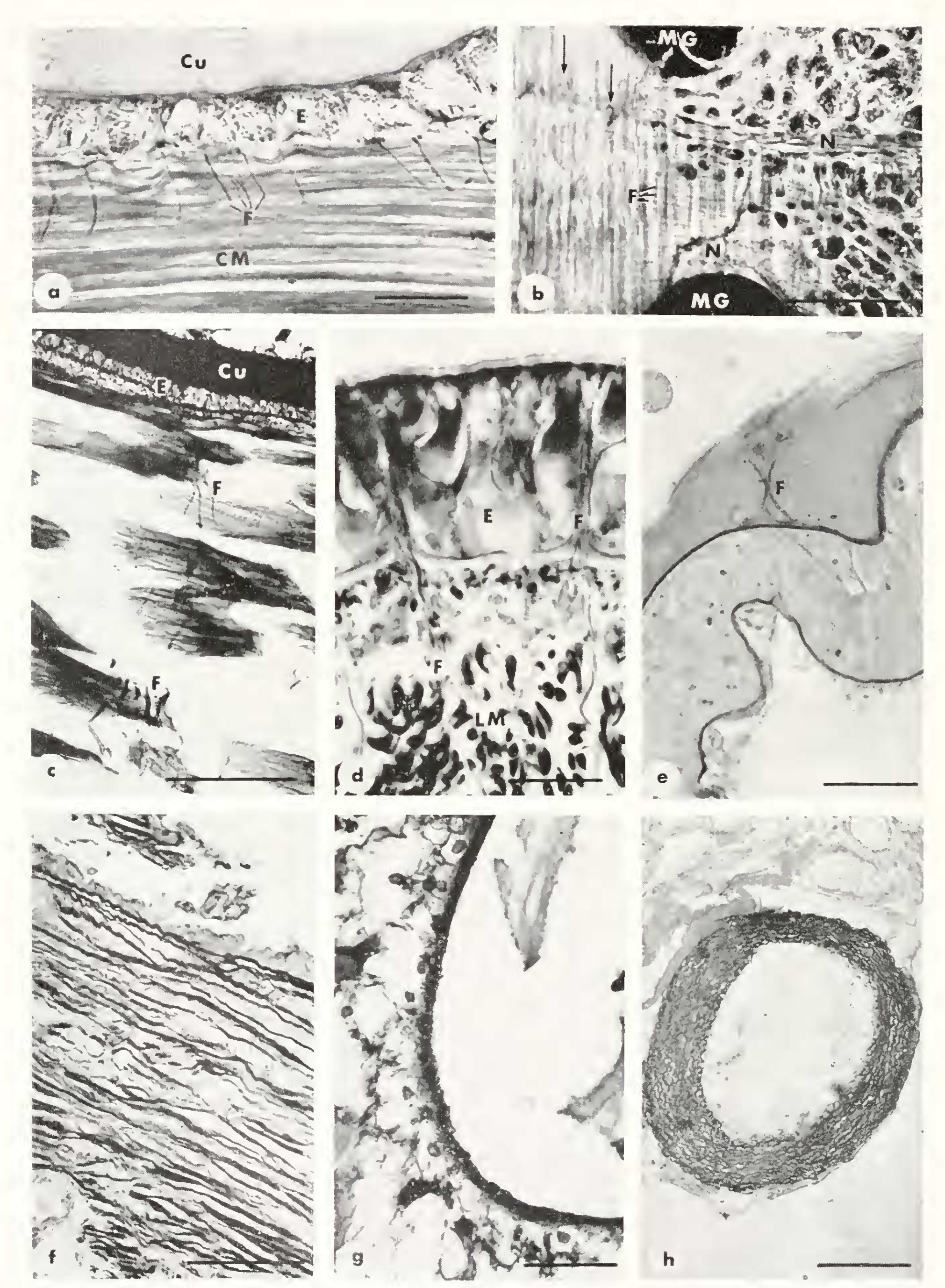
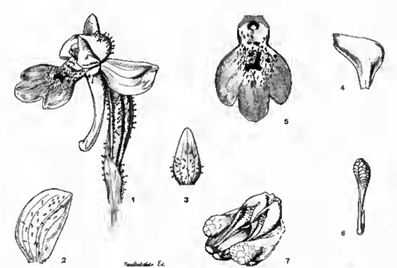


FIGURE 3. (a) A transverse section through the outer layers of the body wall of the sipunculid *Golfingia gouldi* in the trunk region; spirit blue and van Gieson stained. Part of

into the substratum. The everted proboscis then dilates to form a terminal anchor while the longitudinal muscles contract to pull the body forward (Clark, 1964; Trueman and Ansell, 1969). While coelomic pressures of only a few cm of water are employed during burrowing in *Leptosynapta,* with peaks of around 20 cm during burrow consolidation, *Golfingia* was found to utilize pressures of up to 250 cm during rapid burrowing (Hunter and Elder, 1967). A further contrast with burrowers of the lateral scraping type lies in the structure of the body wall. The trunk region of *Golfingia gouldi* possesses a very thick collagenous cuticle and a very thin dermal connective tissue layer (Hyman, 1959 and present observations, Fig. 3a). Radially oriented spirit blue positive fibers are, however, found traversing the thick circular muscle layer (Fig. 3a and Elder and Owen, 1967). At their outer extremities these fibers attach to longitudinally oriented spirit blue positive fibers of the dermal layer (Fig. 3b) and at their inner extremities to the connective tissue around the innermost circular muscle fibers. It is probable that these spirit blue positive fibers are elastic for they follow a straight course in sections from narcotised animals. However, the thickness of the circular muscle layer must increase significantly on contraction and at the same time the length of the longitudinal muscles and longitudinally oriented spirit blue fibers must also increase. The function of the radial fibers is probably to retain the position of the longitudinal muscle blocks relative to the epidermis and cuticle, irrespective of circular muscle contraction.

---

the stout, lamellated cuticle (Cu), which stains like collagen, overlies the cuboidal epithelium (E). From the thin dermis radially oriented spirit blue positive fibers (F) extend through the circular muscle layer (CM); 20 μm bar. (b) Tangential section through the outer layers of the body wall of *Golfingia* in the trunk region; Aldehyde fuchsin and fast green stained. The bases of the epithelial cells with granular cytoplasm are seen to the right and the circular muscle layer to the left. The margins of mucous glands (MG) are seen top and bottom, with associated nerve fibers (N). The system of fine, longitudinally oriented, "spirit blue positive" fibers is seen running within the dermis. These longitudinal fibers link at intervals of every three or four muscle fibers with rows of radially oriented, spirit blue positive fibers (arrows). Other lettering is as above; 50 μm bar. (c) Transverse section through the outer layers of the body wall of the aschelminth *Priapulus caudatus* in the trunk region; spirit blue and van Gieson stained. Unlike the cuticle of *Golfingia* above, the stout cuticle of *Priapulus* stains deeply with spirit blue. Radially oriented, spirit blue positive fibers are seen linking the connective tissue sheaths around the circular muscle fibers. Lettering is as in the previous plates; 50 μm bar. (d) Transverse section through the outer layers of the body of the heteronemertean *Micrura leidyi;* spirit blue and van Gieson stained. Radially oriented, spirit blue positive fibers traversing the outer longitudinal muscle layer (LM) aggregate into bundles which traverse the narrow dermis and penetrate into periodic clefts amongst the ciliated epithelial cells. Lettering is as in previous plates; 20 μm bar. (e) Transverse section through the intestinal wall of the polychaete *Polyphysia crassa;* spirit blue and van Gieson stained. The gut lumen is to the bottom of the field. Spirit blue positive fibers form networks in the walls of the peri-intestinal haemal sinus and periodic columns of radially oriented fibers (F) traverse the sinus lumen; 50 μm bar. (f) Transverse section through the wall of the posterior aortic bulb in the bivalve mollusc *Mya arenaria;* spirit blue and van Gieson stained. Spirit blue positive fibers form concentric lamellae interspersed with muscle fibers and collagen. The lumen is to the top of the field; 100 μm bar. (g) Transverse section of the wall of the dorsal abdominal artery of the crustacean *Nephrops norvegicus;* spirit blue and van Gieson stained. A single, stout, spirit blue positive lamella is present, surrounded by a cuboidal epithelium; 50 μm bar. (h) Transverse section of the anterior dorsal artery in the xiphosuran *Limulus polyphemus;* stained with spirit blue and van Gieson. Concentric layers of spirit blue positive fibers are interspersed with muscle fibers; 200 μm bar.

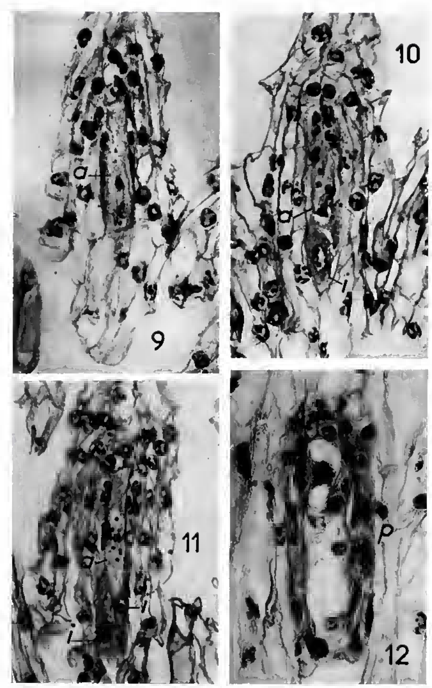


Pl. 4. — **C. ampullacea** H. Perr. : **1**, fleur × 2; **2**, sépale latéral; **3**, sépale médian; **4**, pétale latéral; **5**, labelle × 2,5; **6**, pollinaire; **7**, gynostème × 5.

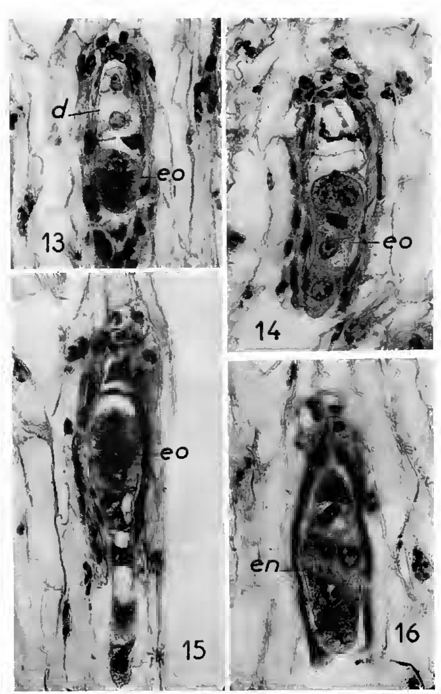
En fin de première division des chromosomes se trouvent isolés en dehors des noyaux télophasiques (fig. 7 à 10). Nous avons pu compter jusqu'à 60 chromosomes au cours de la première division de l'archéspore, mais nous préférons écrire $2n = ca60$ au cas où quelques-uns de ces chromosomes petits et nombreux auraient échappé à notre observation. L'espèce serait donc tétraploïde par rapport à quelques espèces sexuées où $2n = ca30$.

Le plus souvent une cloison sépare les noyaux engendrés par l'archéspore; ce sont alors de véritables dyades; parfois ces 2 noyaux se disposent chacun à une extrémité de la cellule simulant un sac embryonnaire binucléé (Pl. 6, fig. 13). Par la suite, ces noyaux ne se divisent plus et dégénèrent assez rapidement (Pl. 6, fig. 14 à 16), sauf si l'ovule n'est pas embryonné. Dans ce cas, les produits de l'archéspore peuvent s'accroître d'une manière relativement importante et former une polyade ayant jusqu'à 6 noyaux, en partie cloisonnée (Pl. 5, fig. 12).

Tous les embryons développés dans les ovules de ce *Cynorkis* le sont à partir d'une cellule nucellaire épidermique qui peut évoluer de deux manières différentes, soit qu'elle se transforme en initiale d'un proembryon adventif nucellaire, soit qu'elle devienne l'initiale d'un gamétophyte virtuel comme nous l'avons déjà décrit plus haut chez le *C. ridleyi*, initiale qui se transforme directement en embryon omnisaccal diploïde. Par la suite les embryons omnisaccaux seront munis d'un suspenseur filamenteux comme dans les embryons sexués des *Ophrydoideae* (Pl. 6, fig. 13 à 15), tandis que les embryons nucellaires auront un aspect plus globuleux avec un court suspenseur passant insensiblement à l'embryon proprement dit (Pl. 6, fig. 16). Il n'est pas toujours aisé de prévoir le devenir d'une initiale, sauf



Pl. 5. — **C. ampullacea** H. Perr. : **9-11,** autres aspects de la méiose de la CMM; en **10** et **11,** formation respective d'une et de deux initiales (*i*) de gamétophytes virtuels; **12,** polyade (*p*). G × 565.



Pl. 6. — **C. ampullacea** H. Perr. : **13-15**, développement d'embryons omnisaccaux diploïdes (*eo*); **16**, embryon nucellaire (*en*); en **13**, l'archéspore a engendré deux cellules dyades (*d*) qui ont dégénéré dans les autres figures, G. × 565.

lorsque sa forme préfigure l'orientation de l'embryon qui en tirera son origine soit directement, soit indirectement. Dans la figure 10 de la Planche 5, l'initiale est sans aucun doute celle d'un gamétophyte virtuel comme le laisse penser sa forme arrondie au sommet et en pointe à son extrémité. Par contre, dans la figure 11 on ne peut encore savoir quel sera le sort des initiales.

Du côté des microspores on peut noter la présence assez fréquente de tétrades aberrantes à plus de 5 noyaux, généralement de 5 à 6, plus rarement 7, de taille irrégulière, certains à l'état de micronoyaux. Les pollinies semblent d'ailleurs peu fonctionnelles; d'autre part, les sécrétions des stigmates sont faibles et lorsqu'on tente la pollinisation peu de pollen y adhère, dont la germination est particulièrement rare et peu vigoureuse.

Hybride présumé C. lilacina × C. ridleyi H. Perr.

Cette plante est l'ancien *Microtheca madagascarica* R. Schlechter. H. Perrier de la Bathie lui a donné ce nouveau statut car il pensait que cet état hybride et cette parenté devaient être attribués à l'ancien *Microtheca* parce que ses fleurs sont « toujours stériles, à anthères avortées » d'une part, et qu'il cohabite avec ses 2 parents présumés en quelques stations d'autre part. Cette plante est, en effet, remarquable par l'avortement de son appareil pollinaire; cependant, il peut arriver que quelques fleurs présentent une pollinie plus ou moins bien développée. Un si faible pourcentage de pollen serait insuffisant pour assurer une fertilisation régulière et pourtant le *Microtheca* fructifie régulièrement et abondamment.

Les plantes qui ont fait l'objet de nos observations embryologiques proviennent d'un sous-bois clair d'Eucalyptus situé en bordure du chemin qui relie la RN 2 à Ambatomena, à 30 km environ de Tananarive. Parmi les fleurs d'une dizaine de pieds examinés aucune ne présentait de pollinies et les examens microscopiques ont montré, ou mieux confirmé notre opinion que cette espèce était apomictique. Elle l'est, de plus, et forcément, d'une manière autonome et absolue.

L'apomixie se présente soit sous forme d'embryonie adventive nucellaire, soit sous forme d'embryonie omnisaccale diploïde, celle-ci paraissant plus fréquente que la première. Les embryons ainsi formés suppléent au manque de fonctionnement des spores. En effet, l'archéspore, provenant directement d'une cellule nucellaire sous-épidermique (Pl. 7, fig. 17), n'engendre jamais plus de 2 cellules dyades (Pl. 7, fig. 20) dont aucune ne sera à l'origine d'un gamétophyte femelle, et qui dégénéreront avant la fin de l'embryogenèse. Ici aussi l'avenir des initiales est parfois difficile à prévoir, par exemple pour celles des figures 18 et 22 des planches respectives 7 et 8. Par contre, dans la figure 20 (Pl. 7), l'embryon unicellulaire est indiscutablement nucellaire et dans la figure 19 (Pl. 7) les initiales paraissent être celles de gamétophytes virtuels avec leur extrémité distale en pointe. Dans un même ovule les deux sortes d'initiales peuvent se former puisque l'on peut y rencontrer les deux formes d'embryons; en effet dans la figure 26 (Pl. 8), on peut voir un embryon adventif nucellaire et un embryon omnisaccal diploïde opposés par leur sommet.

Quant à l'origine de cette plante, si elle est de nature hybride, elle ne peut l'être entre les espèces présumées par H. Perrier de la Bathie, puisque toutes les formes des *C. ridleyi* et *C. lilacina* que nous avons eu l'occasion d'examiner se sont révélées être apomictiques autonomes absolues et que l'apomixie paraît donc caractéristique de ces espèces. Comme tous les autres *Cynorkis* apomictiques elle nous paraît devoir mériter un nom d'espèce qui lui soit propre; son ancien nom devrait lui être restitué ou plus probablement une combinaison faisant état de ses autres dénominations [1] lui être attribuée.

Chez tous ces *Cynorkis* apomictiques : *C. ridleyi*, *C. ampullacea*, l'hybride présumé *C. lilacina* × *C. ridleyi*, la sexualité est très dégradée puisque nous avons constaté des anomalies polliniques ou l'avortement du pollen, et une gamétogenèse femelle anormale par la méiose de l'archéspore, tout au moins chez le *C. ampullacea*, et incomplète puisque le sac embryonnaire n'est jamais formé, la CMM ne dépassant généralement pas le stade dyade.

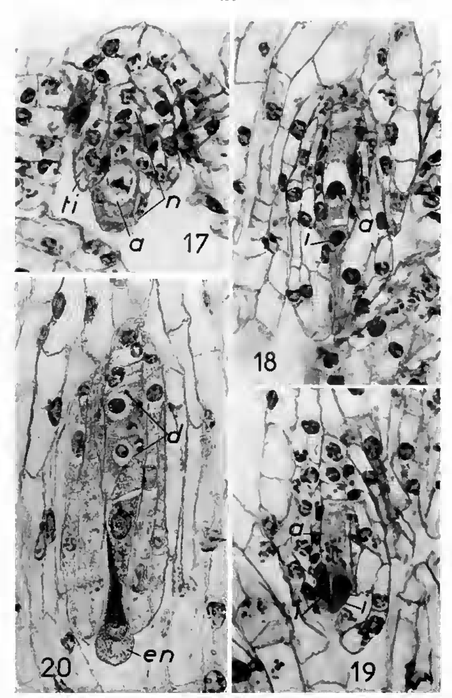
Chez le *C. lilacina* nous avions vu, il y a quelques années, que la sexualité était légèrement moins dégradée puisqu'il peut se former 4 spores femelles ou un sac embryonnaire bien que celui-ci atteigne rarement le stade trinucléé. Cependant, nous ignorons la nature de la première division de l'archéspore. Chez tous les *Cynorkis* apomictiques, en plus des embryons adventifs nucellaires, on trouve soit des embryons sporiques, c'est-à-dire formés aux dépens d'éléments issus de l'archéspore, chez le *C. lilacina*, soit omnisaccaux diploïdes chez les autres connus à ce jour. La présence des embryons sporiques pourrait, peut-être, être en rapport avec cet état moins dégradé de la sexualité du *C. lilacina*.

Néanmoins il y a de fortes présomptions pour que le *C. lilacina* comme les autres *Cynorkis* apomictiques soit de nature hybride comme peuvent le suggérer les anomalies dans les gamétogenèses ou l'état du pollen et le devenir de l'archéspore.

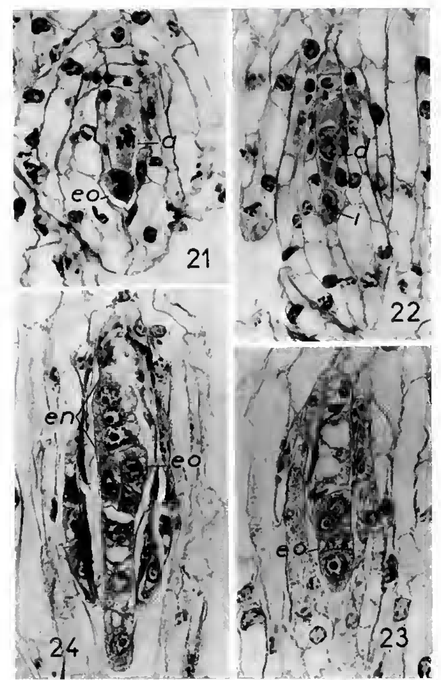
Si donc nous supposons une origine hybride pour ces *Cynorkis* la variation morphologique interspécifique qu'ils présentent — il ne s'agit pas de microformes écologiques — peut s'expliquer par ce phénomène d'hybridation où plusieurs espèces ont pu intervenir et se recroiser. Il n'est pas improbable aussi que les espèces aient varié avant de se croiser comme pourrait le laisser penser la présence de diverses formes chez des espèces sexuées comme les *C. fastigiata* Thou. ou *C. angustipetala* Ridley.

Hybridité et polyploïdie semblent donc dans le cas des *Cynorkis* être les facteurs favorables à l'induction de leur état apomictique. Si l'hybridité a favorisé le rassemblement des gènes nécessaires à l'apparition de ce phénomène, la polyploïdie a pu modifier la physiologie de l'ovule si bien que l'action première du pollen qui, chez les *Orchidaceae*, est celle d'un stimulus auxinique indispensable pour parfaire le développement de l'ovule, est ici inutile.

1. J. Bosser pense que cette espèce existe aussi à la Réunion où elle est connue sous le nom d'*Acrostylia paradoxa* Frapp., lequel est l'ancien *Hemiperis fissirostris* Frapp. Mais ceci a besoin d'être confirmé.



Pl. 7. — Hybride présumé C. lilacina × C. ridleyi H. Perr. : 17, jeune ovule (*a* : archéspore; *n* : nucelle; *ti* : tégument interne); 18, ovule un peu plus âgé dans lequel une cellule de l'épiderme nucellaire commence à se différencier en initiale d'embryon (*i*) ou de gamétophyte virtuel; 19, deux initiales (*i*) bien développées et méiose de la CMM; 20, l'archéspore a formé les dyades (*d*); bon développement d'un embryon nucellaire unicellulaire (*en*); entre la dyade inférieure et l'embryon nucellaire on distingue un autre embryon dont l'origine ne peut être précisée. G × 565.



Pl. 8. — **Hybride présumé C. lilacina × C. ridleyi H. Perr.** : **21,** méiose de la CMM et embryon bicellulaire omnisaccal diploïde (*eo*); **22,** formation des dyades (*d*); **23,** embryon omni saccal diploïde (*eo*) et dyade présentant des signes de dégénérescence; **24,** ovule avec deux embryons, l'un nucellaire (*en*), l'autre omnisaccal diploïde (*eo*). G × 565.

BIBLIOGRAPHIE

AFZELIUS, K. — Die Embryobildung bei *Nigritella nigra;* Svensk Bot. Tidskr. **22**, 1-2 : 82-91 (1928).

GUSTAFSON, Å. — Apomixis in higher plants Part I. The mecanism of apomixis; Lunds Univ. Årsskrift. NF2, **42**, 3 : 3-66 (1946).

PERRIER DE LA BÂTHIE, H. — in H. HUMBERT, Flore de Madagascar, 49e famille, Orchidées, **1** (1939).

SCHLECHTER, R. — Systematischer Teil; Fedde Repert. **33** : 76-78 (1925).

SESHAGIRIAH, K. N. — Morphological studies in *Orchidaceae;* I. *Zeuxine sulcata* Lindley, J. Indian bot Soc. **20** : 357-365 (1941).

STEBBINS, G. L. — Cytology of *Antennaria.* II. Parthenogenetic species, Bot. Gaz. **94** : 322-344 (1932) (d'après GUSTAFSON, 1946).

SWAMY, B. G. L. — The embryology of *Zeuxine sulcata* Lindl., New Phytol. **45**, 1 : 132-136 (1946).

VEYRET, Y. — L'apomixie chez le *Cynosorchis lilacina* Ridley (Orchidacées), C. R. Acad. Sci., sér. D, **265** : 1713-1716 (1967).

Centre O.R.S.T.O.M. de Tananarive
et Institut de Botanique, 91405-ORSAY.